

## 論文

マツノザイセンチュウゲノムの多型性評価に向けた  
マイクロサテライト領域の探索<sup>\*1</sup>久島涼弥<sup>\*2</sup>・田村美帆<sup>\*3</sup>・松永孝治<sup>\*4</sup>・渡辺敦史<sup>\*3</sup>

久島涼弥・田村美帆・松永孝治・渡辺敦史：マツノザイセンチュウゲノムの多型性評価に向けたマイクロサテライト領域の探索 九州森林研究 75：53－58，2021 公表されているマツノザイセンチュウゲノムから2塩基モチーフでは10回以上、3塩基モチーフでは6回以上の繰り返しを示す perfect repeat 型のマイクロサテライト領域をスクリーニングした。全国各地で採集した12のマツノザイセンチュウアイソレイトは遺伝的背景の異なる個体で構成されることから、多数の対立遺伝子を持つと期待されたが、既往の研究同様に必ずしも高い多型性は示さなかった。ゲノム情報に基づく各染色体に座乗するマーカー数は7～17マーカーであった。さらに、既往の研究で報告されているマイクロサテライトマーカーとの重複を確認した結果、5マーカーが重複しており、最終的に53マイクロサテライトマーカーを新たに開発できた。これらのマーカーは病原力の異なるアイソレイトの近交系株のゲノムの均一性評価に利用できると思われる。

キーワード：マツノザイセンチュウ、マイクロサテライト、多型性

**[Abstract]** Microsatellite regions with perfect repeats, >10 repeats for dinucleotide motifs and >6 repeats for trinucleotide motifs, were screened based on published genomes of *Bursaphelenchus xylophilus*, pinewood nematode (PWN). Since PWN isolates are composed of individuals with different genetic backgrounds, large number of alleles were expected to be detected, but as in previous studies, high polymorphism was not shown. The number of markers loci per chromosome showed 7-17 markers. In addition, we checked for overlap with microsatellite markers reported in previous studies and found that five markers from previous studies overlapped, resulting in a final total of 53 new microsatellite markers. These microsatellite markers could be used to evaluate the inbred line of PWN isolates with different virulence

Keywords : pine wood nematode, microsatellite, polymorphism

## I. はじめに

2011年にマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* : pine wood nematode, 以下PWN)のドラフトゲノム(Kikuchi *et al.*, 2011)が解読されて以降、マツ材線虫病の病原性解明に向けて分子生物学的技術が盛んに用いられるようになった。しかし、マツ材線虫病研究でこれまで用いられてきたほとんどのアイソレイトは遺伝的に異なる個体の集合であり、アイソレイト内の個体間でも病原力の強弱にばらつきがあることが報告されている(Shinya *et al.*, 2012)。ゲノムと形質を関連づけるためにはモデル生物のような明確で高度に均一な遺伝子型を持つ生物材料を利用することが望ましい(Taketo *et al.*, 1991)。したがって、病原性解明に向けて均一なゲノムを持ったPWN近交系株の構築が必須となる。

雌雄異体であるPWNではゲノムを均一にする手法には、1ペアの雌雄を繰り返し交配させる手法と2～数頭程度の少数個体群を用いてボトルネックを生じさせ、遺伝的浮動により固定する手法が考えられる。既往の研究(Shinya *et al.*, 2012)では、前者

の手法によって近交系株の作出に成功しているが、雌雄の遭遇する確率が低いこと、自殖による後代の適応度の低下による影響を大きく受けることから近交系株作出までには労力を要する。一方、後者は前者の問題点の一つである雌雄の遭遇確率を改善できると考えられるが、ゲノムが均一になるまでの培養世代数は増加すると考えられる。

いずれの手法を採用したとしても近交系株は、何らかのゲノム解析によってゲノムの均一性を評価する必要がある。Shinya *et al.* (2012)は、7世代および10世代近親交配を繰り返したPWN近交系株に対して、ゲノムの均一性をAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)法(Vos *et al.*, 1995)によって評価した。AFLPは制限酵素で処理したゲノム断片の両端に配列既知のアダプター配列を結合させ、アダプター配列に相補的なプライマーを利用してPCR (polymerase chain reaction)増幅し、得られたバンドパターンに基づいて遺伝的多型性を評価する手法である。AFLP法は、多型の検出効率が高い一方で、ホモ接合体とヘテロ接合体を区別できない優性マーカーであること、供試材料が変わるたびにバンドパターンを個体間で比較する必要性があり、

<sup>\*1</sup> Kushima, R., Tanura, M., Matsunaga, K and , Watanabe, A. : Search for microsatellites to evaluate polymorphism in the genome of pinewood nematode.

<sup>\*2</sup> 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biores. And Bioenvir. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, 819-0395, Japan

<sup>\*3</sup> 九州大学大学院農学研究院 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka, 812-8581, Japan

<sup>\*4</sup> 森林総合研究所林木育種センター九州育種場 Kyushu Regional Breed. Office, Forest Breed. Ctr., For. & Forest Prod. Res. Inst., Koshi, Kumamoto 861-1102, Japan

さらにバンドパターンを得るための実験操作は若干煩雑である。

マイクロサテライトマーカーは、2~数塩基の反復配列であるマイクロサテライト領域に隣接する flanking 領域に特異的な配列と相補的なプライマーを設計し PCR 増幅することによってマイクロサテライト領域の多型性を評価する手法である。マイクロサテライトマーカーは、検出効率が高いことに加え、共優性マーカーであり、PCR だけで簡便に分析できるため、これまで多くの動植物でマイクロサテライトマーカーが開発されてきた。さらに、得られたデータの再現性は高く、データベース化できるため供試材料が変わったとしても蓄積したデータを比較することで解析が可能である。マイクロサテライトマーカーの開発に係る煩雑な実験や初期コストはマーカー開発の欠点とされてきたが、最近ではマーカー開発のための実験操作を省略し、データベースに蓄積されたゲノムデータに基づいて *in silico* でマイクロサテライト領域が探索される事例が増加する傾向にある。PWN のマイクロサテライトマーカーは、これまでに 30 マーカー報告されており (Zhou *et al.*, 2007 ; Jung *et al.*, 2010 ; Mallez *et al.*, 2013), さらに、多くのマイクロサテライトマーカーを開発することによってゲノム全体を網羅し、近交系作出過程におけるゲノムの均一性を評価できる。さらに、マイクロサテライトマーカーは、PWN の連鎖解析やこれまで収集した PWN リソースの多様性解析など幅広い解析に利用できると考えられる。本研究では、すでに公開されている PWN ゲノムを参照することによってゲノムを網羅するマイクロサテライトマーカーの開発を試みた。

## II. 材料と方法

### 1. マイクロサテライトマーカーの探索とマーカー開発

PWN ゲノムからマイクロサテライト領域の探索は、Dayi *et al.* (2020) によって公開されている Ka4C1 のゲノム配列 (<https://identifiers.org/resolve?query=ena.embl:PRJEB40022>) を参照して行った。ゲノムから探索するマイクロサテライト領域は、2 塩基モチーフは 10 回反復以上、3 塩基モチーフは 6 回反復以上を対象とした。AT, GC, AAT や GGC のようにプリン塩基またはピリミジン塩基のみで構成される領域は PCR による良好な増幅が得られにくいことが知られているため、探索対象から除外した。さらに、本条件で特定された領域のうち、モチーフが perfect repeat 型を示す領域だけを候補とし、imperfect 型や compound 型を示すモチーフは除外した。その結果、遺伝子領域から 21 領域、非遺伝子領域から 52 領域の計 73 領域を候補として選抜した。それら候補領域に対して Primer 3 (Untergasser *et al.*, 2012) を利用してプライマー設計を行い、プライマー設計可能であった 59 マーカー (表-1) を以後の実験に供試した。

### 2. 供試材料

第二世代マツ抵抗性品種開発を目的として 2013 年から 5 年間実施された林野庁プロジェクト「マツノザイセンチュウ抵抗性品種開発技術高度化事業」では、日本各地から収集された PWN に基づいて 186 アイソレイトが作出されている (松永・渡辺, 2018)。このうち、12 アイソレイトを本研究で供試した (表-2)。

### 3. DNA 抽出

12 アイソレイトは、それぞれ PDA 培地に生育させた *Botrytis cinerea* 菌そう上で 25 °C で 1 週間培養後、ベールマン法により PWN を分離した。アイソレイトから単離された PWN を含む懸濁液はそれぞれスクリーキャップチューブに分注し、液体窒素で凍結させた。凍結サンプル中にジルコニアビーズを入れ、卓上細胞破砕機 セルデストロイヤー PS 2000 (バイオメディカルサイエンス) を用いて凍結させたまま材料を破砕した。破砕した各サンプルはそれぞれ ISOGENOME (ニッポンジーン) のプロトコルに従って DNA 抽出した。

### 4. マイクロサテライト分析

各アイソレイトから得られた DNA を用いて、渡辺ほか (2019) および Mukasyaf *et al.* (2021) に従ってマイクロサテライト分析を行った。得られた対立遺伝子の解析には Microsatellite Analysis Software (Thermo Fisher Scientific) を利用した。

### 5. マイクロサテライトマーカーの多型性の検証

マイクロサテライト領域の多型の評価を行うため、12 アイソレイトを同頭数混合した PWN 混合株を作出した。12 アイソレイトそれぞれの培養は前出の通りである。得られた PWN を含む懸濁液は各アイソレイト 10  $\mu$ l をそれぞれ混合し、PDA 培地上で混合株を作出した。

## III. 結果と考察

### 1. マイクロサテライトマーカーの評価

本研究で設計した 59 領域のうち qBx\_SSR 026 を除く 58 領域で解析可能な対立遺伝子を示すピークが認められた。12 アイソレイトで観察された総対立遺伝子数 (Na) が 1 であった領域は 9 であり、Na が 2 を示す領域は 18 領域であった (表-1)。同様に 3 および 4 を示した領域は 12 領域、5 は 5 領域、6 は 2 領域であった。

一般的に、マイクロサテライト領域を DNA マーカーとした場合、極めて高い多型が報告される事例は数多い。Zhou *et al.* (2007) は日本各地で採集された 9 アイソレイトに 8 マイクロサテライトマーカーを適用した際、平均対立遺伝子数が 4 であることを報告し、PWN は他の生物のマイクロサテライトマーカーに比べて多型が低いことを指摘した。Mallez *et al.* (2013) もまた、PWN の原産地であると考えられている北米で採集された 6 アイソレイトに加え、日本、中国、ポルトガル、カナダに起源を持つ計 10 アイソレイトに 17 マイクロサテライトマーカーを適用した際、平均対立遺伝子数は 4.7 となり、Zhou *et al.* (2007) の報告とほぼ一致している。本研究でも、58 領域で得られた平均対立遺伝子数は 2.9 となり、低い値を示した。

本研究では、PWN ゲノム全体から *in silico* でマイクロサテライト領域を探索したため、遺伝子・非遺伝子領域両方からマイクロサテライト領域がスクリーニングされている。qBx\_SSR 001~qBx\_SSR 018 までは遺伝子領域から、qBx\_SSR 019 以降は非遺伝子領域からのマイクロサテライト領域となる。一般的に、遺伝子領域由来と非遺伝子領域由来のマイクロサテライトでは、遺伝

表-1. 開発したPWNマイクロサテライト59マーカー

marker	motif	forward (5'-3')	reverse (5'-3')	Na	NP
qBx_SSR001	(GA)10	AAAGCGCGCTATGTCAGATT	TACGGTGTCTGATTTCATGC	3	0
qBx_SSR002	(AG)13	GTGTTCTTTGGCTGTGCACTC	TTTAGCGTAGTCCCCAGAGGT	4	1
qBx_SSR003	(AAC)6	CAAATTTTGGCGTAATTTTAGGT	TTAATTCGCTTGCTATGTTGATA	4	0
qBx_SSR004	(AAC)6	GGCTTCGATTCCATTTTCAAC	TGCGAAAAGCGAAGCAATAAC	1	0
qBx_SSR005	(AGA)6	GTCTCCGAGCCAAAACCTTAC	CCGGAATGGGATCGGTTTCATT	3	1
qBx_SSR006	(AGA)6	AATTTGCGTTTGTTCAGGTG	AATTGAACCTCTTCGCTTGC	6	6
qBx_SSR007	(ATG)6	GGAAGCATTTTGCACATTT	GGATATGGTGGTGGCTATGG	3	0
qBx_SSR008	(CCA)6	CAGCTGCCAGGGATACA	GTAGTTGCCGAGGTCTGTC	3	6
qBx_SSR009	(CCA)6	CCATTTGTTCAAAGGGCAGT	CTGCACAAATACTGCTGGTGA	2	2
qBx_SSR010	(CCA)6	CATCGACCTTTTCCAGAATGA	ATGCAAAATTC AACCGGTCA	2	3
qBx_SSR011	(CCA)6	TCATTGCTTTTCCAGAATGAGA	CGTTAACTTTGGGACAGTCCAG	1	0
qBx_SSR012	(CTT)6	ACTCGTGTGAAACGGTAAA	CATCATCCGATTCTTCGACAT	2	2
qBx_SSR013	(GTG)6	GCGCCAAGAGTCAGAATAC	GGGGAAGTGCACACTCAACT	1	0
qBx_SSR014	(TCC)6	ATTTGGTGGAGGTCCAGAAG	ATGTCCCACAACAAATGCAA	4	1
qBx_SSR015	(TCG)6	TCGAGATCTTGGGATCGTATTT	GTTCTCACCTCCATCCATC	1	0
qBx_SSR016	(TGA)6	CCTGAGGAGGAAATGATGA	CAGAGGAATTCATCAGCAA	2	1
qBx_SSR017	(ACC)7	CAGCTAGGTCGAAGCGTTCT	CGGTGCAAATTGAAGAATCA	3	1
qBx_SSR018	(AAC)9	TTGTCAAAGTTCTTTCGGGATG	CTGCATCTGCTCCAGTGTA	5	3
qBx_SSR019	(AC)10	CGACGCCATGATATACCCTAA	TCCTCTGTTTATTCGGGTTTC	3	0
qBx_SSR020	(AC)10	TGCAAAGAATCCTCCGTTTT	ATAAGCTCGTCGCCAATAA	3	0
qBx_SSR021	(AG)10	GACGAAGAGGTTTGCAGGAA	GACGCTTCCCTTGTGAAAAA	2	0
qBx_SSR022	(AG)10	TGCATCGCTGAATTGAAAAG	AATTTTTGGGGCGAGAGAGT	2	0
qBx_SSR023	(AG)10	ACAAAACATGTCATTTGCTTCG	CTTCCCTTCTCTCTGCCTTTT	4	4
qBx_SSR024	(CA)10	TTTCGTCGAAAGAAAAGGT	GCCTGGAAGAAGATGCTGTC	4	1
qBx_SSR025	(CA)10	CGCTCTCCTTCCCTTCGTATT	TTCCAACGGAGAATGTAAACG	2	0
qBx_SSR026	(CA)10	CTTCAGCCGAGAGACGAAAC	ATTGCTTCTTCCCAAACCT	-	-
qBx_SSR027	(CT)10	TGGTACGTTTCTTGCCACTG	CACACGATTTGACATAGGG	5	1
qBx_SSR028	(CT)10	ATCTTTTCCGCACGAAGCTA	AAGTGCACGCTCAGATTTT	1	0
qBx_SSR029	(CT)10	CTTTTTCCATGCGAAACTGC	GCCTGACTGCGAAAAGAAC	1	0
qBx_SSR030	(GA)10	TCCATTCCACTCGGAGAATC	AGAGCCCTCCAAAACACCT	2	1
qBx_SSR031	(GT)10	ACTTTCCAGTGCAGACGTT	TGTAATTAGCGGGCCCATAC	5	2
qBx_SSR032	(GT)10	TCCACTGAAAACCTCAACC	CGTAAAAGCCGCGTAGTAA	4	1
qBx_SSR033	(TC)10	ACATCGGGGAAAAACAACCTG	GGATGTACCAGGCAAAGGAA	1	0
qBx_SSR034	(TC)10	CGGAAAAGAGTCCCTACGTC	TTGTCGAGTACGGTTGTGGA	2	0
qBx_SSR035	(CT)11	TTTCATCTCTGGCCGAACCT	ATTTTTCCGCGACACAATTC	4	0
qBx_SSR036	(TC)11	AAAGACTCGACCCAATGGTG	GCATACGGGCTTGTGAAGT	1	0
qBx_SSR037	(CT)12	ACCCTTACCATAACCCCTCAAC	GTAGAAATGGGCCAATTGAAAA	4	1
qBx_SSR038	(GA)12	TGTACAGAGGTTTGGCAGCA	TGTTTTTGCGAAACATTGA	6	2
qBx_SSR039	(GA)12	ATTTACGTCCTGGGTAAGCAGTT	ACACAGGAAATCTCAAAGGTCAA	5	0
qBx_SSR040	(GA)12	AGGTATTGCGTGTTTTTCATGG	ACGATTGAACACCCTTCAGTG	3	0
qBx_SSR041	(AG)13	TGTGTGAAAGCTACTGCTCCA	CACTTGGGGTACTTCCCTTGT	2	0
qBx_SSR042	(AG)14	TTGATTTCCCGTGTTTTTTC	CCCCTCCGAACACTAAAGGT	4	3
qBx_SSR043	(CA)17	AAACAAATGGCCACACTTCC	AAATATCCGGTCGCACAAAG	4	2
qBx_SSR044	(TC)18	TATGCTTGATACCCCGGAAA	TGCATAAATCATGGGGGATT	5	2
qBx_SSR045	(GA)21	GCTGTAAGTGTGGGACGTGAT	CCAATAAAGCGTCATGCCTAT	2	0
qBx_SSR046	(AG)33	CCACATCGCTATGGGAATTT	GGCTTTTGGCCTAGAAATGG	2	1
qBx_SSR047	(CT)34	CTAATTCAGTCAGCCCTTTCCA	GGGAAGTACTCCAAATGAGACG	2	0
qBx_SSR048	(TC)34	ATTCAGTGAAGCCCGAGAA	TTTAAGCCGTCGGTTTCATC	4	1
qBx_SSR049	(AAC)6	ATAGGGGGATGGGAGAGTTG	CCAGAGCGAAGACCAAAAAC	2	0
qBx_SSR050	(AAG)6	GGATTTGGAGGGGTTAATCG	GCCTTGGTGCTTACAGACT	2	0
qBx_SSR051	(ACT)6	TCTCAGCCAAAACCTCTGAA	GGCATTATTGGAGGGAATGA	3	1
qBx_SSR052	(AGA)6	TCGTCTTCTCCCCATTATCG	CGTTTTTCAACCGCTCTCTT	3	0
qBx_SSR053	(AGA)6	TTTTGGCGCAATAAAAACCTC	GCGAAGCCATGTGTATGAAA	3	0
qBx_SSR054	(AGC)6	TTTTTGCTTCAACGACACGA	CTCAAGCCGCAAGAAAATC	3	2
qBx_SSR055	(AGG)6	CTTGACGTGAGCAAAAACGA	TGGTGAATTTGATGAGCGAGA	2	0
qBx_SSR056	(TCC)6	GGCAGCCGGAGTAAAAGTAG	TCTTCCGACTGATTGTGCAG	4	0
qBx_SSR057	(CAA)7	CTGCGACAAATCAGGACCTT	ATGCAATTTTCAATGCGACA	1	0
qBx_SSR058	(TAC)8	ATATTACGAAGAGCCGGAGGA	CACGACAAAATGTGTCTGCAC	2	0
qBx_SSR059	(GTA)21	GCAGAGGGAGTTGTGGTTGTA	CTGAAACAACAACGGAGACAA	2	0



表-2. 12アイソレイトの採集地点

NO	アイソレイト	市町村	北緯 (°)	東経 (°)
1	深浦402	青森県西津軽郡深浦町	40.446	139.941
2	陸前高田市33	岩手県陸前高田市横田町	39.078	141.585
3	新潟糸魚川383	新潟県糸魚川市	37.025	137.864
4	Ka4	茨城県笠間市	36.345	140.304
5	東尋坊1	福井県坂井市三国町	36.250	136.132
6	出雲1	島根県出雲市大社町	35.416	132.684
7	能勢1	大阪府豊能郡能勢町	35.000	135.376
8	久米南1	岡山県久米郡久米南町	34.934	133.993
9	天竜川北	静岡県浜松市浜北区	34.825	137.823
10	島原	長崎県島原市有明町	32.850	130.337
11	貝津2	長崎県諫早市貝津町	32.833	130.024
12	今帰仁	沖縄県国頭郡今帰仁村	26.656	127.981

子領域由来のマイクロサテライトの多型性が低くなる傾向にある(例えば, Varshney *et al.*, 2005)。そのため, 遺伝子領域由来のマイクロサテライトが少ない対立遺伝子数の原因となっている可能性が考えられた。しかし, マイクロサテライト領域の平均対立遺伝子数は, 遺伝子領域由来で2.8, 非遺伝子領域由来では2.9となり, 遺伝子領域と非遺伝子領域由来間で対立遺伝子数に差異はなかった。

遺伝的多様性研究の場合, 多型性の高いマーカーを選抜し, 分析, 解析に選択する傾向にある。Mallez *et al.* (2013) は15マーカーを用いているが, 本研究で対立遺伝子数が4以上を示した19のマイクロサテライト領域について平均対立遺伝子数を再計算した結果, 4.5となり, 既往の研究とほぼ一致する。しかし, PWNのマイクロサテライト領域における多型は, 他の生物種で認められてきたほど高くない傾向にあることが本研究からも支持された。マイクロサテライト多型が低い要因はPWNの小さいゲノムサイズに起因している可能性もあるが現段階では明確ではない。

表-1には, Naだけでなく, アイソレイト内で複数の対立遺伝子が検出されたアイソレイト数(NP)を示した。例えば, qBx\_SSR001では, Naは3であり, NPは0であることから, 12アイソレイト間では3つの対立遺伝子が確認されたものの, すべてのアイソレイトでアイソレイト内に複数の対立遺伝子は認められず, 見かけ上, 各アイソレイトはホモ接合体と同様のピークを示していた。qBx\_SSR002では, Naが4, NPが1であり, 12アイソレイト間で4つの対立遺伝子が認められ, NPが1であったのはアイソレイト島原のみであり, 島原は見かけ上, ヘテロ接合体を示す複数の対立遺伝子を示すピークが観察された。アイソレイトは遺伝的背景の異なる多数の個体で構成されるため, アイソレイト内で極めて多くの対立遺伝子が観察されることが期待された。しかし, 58マーカーのうち23マーカーではNaが2以上, かつNPが0となり, アイソレイト間で異なる対立遺伝子が確認されたものの, アイソレイト内は同一対立遺伝子のみが存在する

結果を示した。アイソレイトは, マツ枯損1個体の木片から単離したPWNを約30頭程度釣り上げて作出する。その後, 培養してアイソレイトを維持するため, 単離から継代培養による段階でアイソレイト内で近親交配が進み, 特定の対立遺伝子が固定している可能性が考えられる。

遺伝的背景の異なる個体群であるアイソレイトで高いマイクロサテライト多型を示さなかった別の要因も考えられた。使用した12アイソレイトの混合株を作出し, 分析に供試した結果, 対立遺伝子数が2以上を示した領域は44となり, アイソレイトごとに分析して対立遺伝子数が2以上を示した49領域よりも少なくなった。さらに, アイソレイトごとに分析して確認された対立遺伝子の全てを確認することはできなかった。これは, 混合株内でアイソレイトが保有する対立遺伝子に偏りが生じ, メジャーな対立遺伝子とマイナーな対立遺伝子が生じたことがアイソレイトごとに分析した全ての対立遺伝子数を確認できなかった要因と考えられた。特定の対立遺伝子を保有する後代の個体が混合株内で少ない場合には, その対立遺伝子は検出されず, 解析から除外されたことになる。この仮説は各アイソレイトの個体群にも適用され, アイソレイト内には複数の異なる対立遺伝子を保有する個体が存在するが, その個体群がマイナーである場合にはその対立遺伝子は検出されず, メジャーな対立遺伝子のみが検出されたことにより, 見かけ上, 各アイソレイトはホモ接合体として検出された可能性がある。マイナーな対立遺伝子も含め, アイソレイト内の多様性を明らかにするためには実際に個体単位での分析が必要であり, マイクロサテライトマーカーの能力を正確に評価するためにも近交系株作出前段階で対象とするアイソレイト内の多様性を確認する必要がある。

## 2. マイクロサテライトマーカーによる近交系の確認

PWNは6つの染色体を持つことが報告されている(Kikuchi *et al.*, 2011)。Dayi *et al.* (2020) は, 6つの染色体に対応すると考えられる Scaffold を含め, 11 Scaffold を報告した。本研究では, Dayi *et al.* (2020) の Scaffold に基づいてマイクロサテライト領域を探索したことから, 染色体に対応する Scaffold から各染色体のマイクロサテライト領域数を明らかにすることができる。その結果, 指定した条件で最も多くのマイクロサテライト領域が存在したのは, CAJFDI010000006.1の17座であった(表-3)。同様に, CAJFDI010000004.1では12座であった。残る4 Scaffold に座乗するマイクロサテライト領域は, 7または8であった。

AFLPマーカーを利用した場合, マーカーを Scaffold 上に位置づけるためには, 各マーカーの塩基配列を改めて決定する必要がある。本研究で示したマイクロサテライトマーカーを利用すれば, 染色体ごとのホモ接合体を示す割合を世代単位で明らかにすることができる。マイクロサテライトマーカーから得られるデータは数値データとして蓄積可能であることから, 各染色体ごとにホモ接合体の増加割合を世代を通じて比較し, ホモ接合体の増加が平衡に達する時をPWNゲノムの均一性評価の目安にすることが可能である。次世代シーケンスが安価になったとはいえ, 世代ごとの評価を行うためには一定のコストを必要とする。そのため, マイクロサテライトマーカーを利用して世代ごとのゲノムの均一性の変化をモニタリングし, 平衡に達したと考えられる世代の近

表-3. 6 scaffold に座乗するマイクロサテライトマーカーの位置

CAJFDI010000001.1		CAJFDI010000002.1		CAJFDI010000003.1		CAJFDI010000004.1		CAJFDI010000005.1		CAJFDI010000006.1		
start bps*	marker	start bps	marker	start bps	marker	start bps	marker	start bps	marker	start bps	marker	
1	2188577	qBx_SSR056	812145	qBx_SSR002	766639	qBx_SSR001	220658	qBx_SSR059	1950148	qBx_SSR024	877567	qBx_SSR033
2	2223079	qBx_SSR021	2147225	qBx_SSR037	1822297	qBx_SSR057	2689017	qBx_SSR047	2475941	qBx_SSR044	979770	qBx_SSR029
3	2224127	qBx_SSR027	4199181	qBx_SSR048	2130129	qBx_SSR043	5817144	qBx_SSR012	5551280	qBx_SSR005	3476344	qBx_SSR030
4	2241519	qBx_SSR022	4300026	qBx_SSR036	2440939	qBx_SSR003	6491739	qBx_SSR008	8466974	qBx_SSR050	4448229	qBx_SSR013
5	3873081	qBx_SSR018	9544197	qBx_SSR041	2506240	qBx_SSR017	7070332	qBx_SSR039	9380131	qBx_SSR055	7253538	qBx_SSR016
6	10869735	qBx_SSR046	10731209	qBx_SSR023	4653639	qBx_SSR014	9679453	qBx_SSR007	11485118	qBx_SSR032	7319128	qBx_SSR004
7	11057124	qBx_SSR038	11706092	qBx_SSR031	10744086	qBx_SSR052	9688754	qBx_SSR009	12098794	qBx_SSR058	8673532	qBx_SSR010
8	11427941	qBx_SSR042			12304502	qBx_SSR015	10027746	qBx_SSR019			8677252	qBx_SSR011
9							11032623	qBx_SSR040			9286296	qBx_SSR045
10							11869274	qBx_SSR020			9606693	qBx_SSR034
11							12515270	qBx_SSR028			10957891	qBx_SSR054
12							12545342	qBx_SSR053			11563426	qBx_SSR006
13											11675766	qBx_SSR025
14											12093976	qBx_SSR049
15											12337624	qBx_SSR035
16											12436829	qBx_SSR026
17											12724909	qBx_SSR051

\* Scaffold 内でそのモチーフの最初の塩基の5' 端の位置を示す

表-4. 既往の研究と本研究で重複が認められたマイクロサテライトマーカー

NO	既往の研究	本研究
1	Bx02	qBx_SSR023
2	Bx03	qBx_SSR039
3	Bx06	qBx_SSR020
4	Bx07	qBx_SSR034
5	PWN_51	qBx_SSR034
6	PWN_60	qBx_SSR026

Bx02-07は Zhou *et al.* (2007), PWN\_51と60は Mallez *et al.* (2013) によって報告された。

交系株のみを次世代シーケンスに供試することでコスト・労力両面で効果的に均一性を検証できる。

本研究以前に PWN のマイクロサテライトマーカーは、30 マーカー報告されていた。そこで、本研究で示したこれらマーカーが既往の研究と重複するかについて、BLAST 検索によって評価した。公表されているマーカーのうち、2 報はマーカーの対象となる塩基配列が GENBANK に登録されていたことから塩基配列に基づいて、残る 1 報は GENBANK への登録がなかったことからプライマー配列に基づいて BLAST 検索した。その結果、Zhou *et al.* (2007) からは 4 マーカーが、Mallez *et al.* (2013) からは 2 マーカーが重複した (表-4)。Jung *et al.* (2010) と重複する

マーカーは認められなかった。Zhou *et al.* (2007) の Bx 07 と Mallez *et al.* (2013) の PWN\_51 は、ともに本研究の qBx\_SSR 034 と同一領域であったことから、本研究で新たに開発されたマイクロサテライトマーカーは 53 であり、重複するマーカーを除き、既往の研究と合わせて計 83 マイクロサテライトマーカーを PWN 研究に現段階で利用できることが明らかとなった。スリッページやサイズホモブラシーの影響を考慮して、perfect repeat 型のモチーフのみを利用するのであれば、さらに既往の研究から 7 マーカー除外することになるため、計 76 マーカーとなる。PWN マイクロサテライト領域における多型性は必ずしも高くない結果が示唆されているものの、近交系株の評価を行う上でのマーカー数は一定数確保されたと言える。

しかし、現在の各アイソレイトで多くのマーカーがホモ接合体として検出されたことは、マイクロサテライトマーカーを利用した近交系株の均一性評価の大きな障害となる。そのため例えば、近交系株の作出を異なる遺伝的背景を持つアイソレイト由来の個体間での交配を進めるなどの工夫が必要であると考えられる。

#### IV. おわりに

マイクロサテライトマーカーは、開発されれば PCR ベースで容易に分析可能であり、多検体を高い再現性で処理できる最も安価なマーカーの一つである。本研究では、PWN の近交系株作出に向けたマイクロサテライトマーカーの適用について示した。こ

ここで示したマイクロサテライトマーカーはその他の研究, 例えば各アイソレイトの遺伝的多様性を評価できる方法の確立などにより, 日本への侵入後の各地への分布拡大過程などの幅広い研究に適用できる汎用性の高い DNA マーカーでもある。

### 引用文献

Dayi M *et al.* (2020) Microbiology Resource Announcements 9 : e 01002-20.  
Jung J *et al.* (2010) Genes Genomics 32 : 151-158.  
Kikuchi T *et al.* (2011) PLoS Pathog. 7 : e 1002219.

Mallez S *et al.* (2013) PLoS ONE 8 : e 59165.  
Mukasyaf A *et al.* (2021) Forests 12 (1) : 72.  
松永孝治・渡辺敦史 (2018) 森林遺伝育種 7 : 115-119.  
Shinya R *et al.* (2012) Applied entomology and zoology 47 : 341-350.  
Taketo M (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 : 2065-2069.  
Untergasser A *et al.* (2012) Nucleic Acids Res 40 : e 115.  
Varshney RK *et al.* (2005) Trends in Biotechnology 23 : 48-55.  
Vos P *et al.* (1995) Nucleic Acids Res 23 : 4407-4414.  
渡辺敦史ほか (2019) 日林誌 101 : 298-304.  
Zhou Z *et al.* (2007) Phytopathology 97 : 304-310.

(2021 年 11 月 15 日受付 ; 2022 年 1 月 8 日受理)